

Express Mail No. EV 377 492 738 US

Inventor: Kozo TSUBOUCHI

Title: Production of Functional

日 本 国 特 許 庁 Polypeptides Originating  
JAPAN PATENT OFFICE from Silk Protein and Use Thereof

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日                      2 0 0 3 年    3 月 1 4 日  
Date of Application:

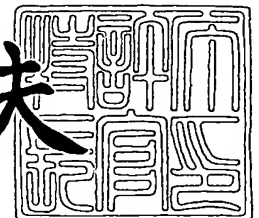
出 願 番 号                      特 願 2 0 0 3 - 0 7 1 0 3 5  
Application Number:  
[ST. 10/C]:                      [ J P 2 0 0 3 - 0 7 1 0 3 5 ]

出      願      人                      独立行政法人農業生物資源研究所  
Applicant(s):                      坪内    紘三

2 0 0 4 年    2 月 2 0 日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

今 井 康 夫



出証番号    出証特 2 0 0 4 - 3 0 1 2 1 4 9

【書類名】 特許願

【整理番号】 PSK0302016

【提出日】 平成15年 3月14日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C07K 01/00

【発明者】

    【住所又は居所】 茨城県筑波郡谷和原村絹の台3丁目3-1-9-302

    【氏名】 坪内 紘三

【特許出願人】

    【識別番号】 501167644

    【住所又は居所】 茨城県つくば市観音台二丁目1番地2

    【氏名又は名称】 独立行政法人 農業生物資源研究所

    【代表者】 岩渕 雅樹

【特許出願人】

    【識別番号】 597094352

    【住所又は居所】 茨城県筑波郡谷和原村絹の台3丁目3-1-9-302

    【氏名又は名称】 坪内 紘三

【代理人】

    【識別番号】 100103805

    【住所又は居所】 東京都新宿区高田馬場1丁目29番21号 みかどビル  
5階

    【弁理士】

    【氏名又は名称】 白崎 真二

    【電話番号】 03-5291-5578

【手数料の表示】

    【予納台帳番号】 065021

    【納付金額】 6,300円

【その他】 国以外のすべての者の持分の割合 30 / 100

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【物件名】 持分証明書 1

【提出物件の特記事項】 追って補充する

【包括委任状番号】 0115153

【包括委任状番号】 0117490

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 絹タンパク由来機能性ポリペプチドの製造と利用

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

家蚕又は天蚕由来の絹タンパク原料であって、該絹タンパク原料の平均分子量が 20 万以上であり、家蚕由来の絹タンパク原料の場合には、絹フィブロインの H 鎖、L 鎖及びセリシン a の少なくとも一部又は全部が分解しないで残存している絹タンパク原料を、中性塩水溶液に溶解し、次いで、ペプチド結合切断物質を用いて処理し、絹タンパクの特異的アミノ酸残基間のペプチド結合を切断することを特徴とする、平均分子量が 1 万以上 20 未満であり、細胞生育促進性、展延性等にすぐれた絹タンパク由来の機能性ポリペプチド組成物の製造方法。

【請求項 2】

絹タンパク原料が、家蚕又は天蚕の吐糸した繭糸、繭糸の加工物である生糸もしくは絹糸、絹織編物の未精練物、半精練物もしくは精練物から選ばれる 1 種以上からなる絹タンパク原料であることを特徴とする、請求項 1 記載の絹タンパク由来の機能性ポリペプチド組成物の製造方法。

【請求項 3】

絹タンパク原料の中性塩水溶液を、ペプチド結合切断物質を用いて処理した後、得られたポリペプチド組成物を脱塩処理に付すことを特徴とする、請求項 1 記載の絹タンパク由来の機能性ポリペプチド組成物の製造方法。

【請求項 4】

ペプチド結合切断物質が、酵素、ヒドロキシルアミンおよび希酸であること特徴とする、請求項 1 記載の絹タンパク由来の機能性ポリペプチド組成物の製造方法。

【請求項 5】

ペプチド結合切断物質が、ヒドロキシルアミンであること特徴とする、請求項 1 記載の絹タンパク由来の機能性ポリペプチド組成物の製造方法。

【請求項 6】

ペプチド結合切断物質が、リジルエンドペプチターゼ、キモトリプシン、パパ

イン、ペプシン、トリプシン及びサーモリシンから選ばれる酵素であることを特徴とする、請求項 1 記載の絹タンパク由来の機能性ポリペプチド組成物の製造方法。

【請求項 7】

特異的アミノ酸残基間のペプチド結合が A s n - G l y 結合であることを特徴とする、請求項 1 記載の絹タンパク由来の機能性ポリペプチド組成物の製造方法。

【請求項 8】

平均分子量が 1 万以上 20 未満であり、細胞生育促進性、展延性等にすぐれた絹タンパク由来の機能性ポリペプチド組成物が、水溶液の形態であることを特徴とする、請求項 1 記載の機能性ポリペプチド組成物の製造方法。

【請求項 9】

家蚕又は天蚕由来の絹タンパク原料であって、該絹タンパク原料の平均分子量が 20 万以上であり、家蚕由来の絹タンパク原料の場合には、絹フィブロインの H 鎖、L 鎖及びセリシン a の少なくとも一部又は全部が分解しないで残存している絹タンパク原料を、中性塩水溶液に溶解し、次いで、ペプチド結合切断物質を用いて処理し、絹タンパクの特異的アミノ酸残基間のペプチド結合を切断した後、脱塩処理に付すことにより得られる平均分子量が 1 万以上 20 未満であり、細胞生育促進性、展延性等にすぐれた絹タンパク由来の機能性ポリペプチド水溶液。

【請求項 10】

家蚕又は天蚕由来の絹タンパク原料であって、該絹タンパク原料の平均分子量が 20 万以上であり、家蚕由来の絹タンパク原料の場合には、絹フィブロインの H 鎖、L 鎖及びセリシン a の少なくとも一部又は全部が分解しないで残存している絹タンパク原料を、中性塩水溶液に溶解し、次いで、ペプチド結合切断物質を用いて処理し、絹タンパクの特異的アミノ酸残基間のペプチド結合を切断した後、脱塩処理に付すことにより得られる平均分子量が 1 万以上 20 未満であり、細胞生育促進性、展延性等にすぐれた絹タンパク由来の機能性ポリペプチド水溶液を、フィルム化、粉末化、ゲル化または乳化することにより、スキンケアのた

めの医薬品、医薬部外品、化粧品素材として使用する方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、細胞生育促進性、展延性等にすぐれた絹タンパク由来の機能性ポリペプチド組成物、その製造法およびそのスキンケア用素材としての医薬品、医薬部外品、化粧品、食品等の分野への利用に関する。

【0002】

【従来の技術】

絹糸は手術糸として古くから使われてきたことから、絹タンパクは生体適合性素材と考えられ、最近では衣服以外の分野へ絹糸を新しく利用するための開発が盛んになっている。

例えば、利用分野としては、絹糸を溶解して絹タンパク水溶液とした後に、これを凝固・乾燥・粉碎等により粉末化することにより、化粧用添加材として、また絹タンパク水溶液を平板上でキャスト等によりフィルム状物することにより、細胞培養床や創傷被覆材およびコーティング材として、また絹タンパク水溶液をゲル状物とし、食品や化粧品として利用するための開発が進められている（特許文献1-11参照）。

【0003】

このように絹素材は、絹糸を絹タンパク水溶液とした後に、粉末、フィルム、ゲル等の形に加工して利用されている。

これら絹素材の加工においては、絹糸を溶解するのに、主に中性塩が用いられているが、絹糸タンパクの中性塩水溶液がヒトの細胞生育促進性を有することについては言及されていない。

さらに絹新素材開発が進む過程で、絹タンパクは細胞生育性、抗酸化性、抗菌性、アルコール消化性、抗血液凝固性等、多様な機能を有すると言われるようになってきた。

【0004】

本発明者らは絹タンパクの有する細胞生育機能に注目し、繭糸または絹糸を溶

解した後に、これを粉末、フィルム、ゲル等に変えることで、これらをスキンケア素材として創傷被覆材や化粧品として利用するための開発と機能解明の研究を進めてきた（特許文献 12-14 参照）。

#### 【0005】

さらに、細胞生育機能が絹タンパクのどのような部位、または構造に起因するかについて、絹タンパクを構成する成分の分離、精製、回収と機能評価を行ってきた。その結果、絹タンパクを構成するフィブロインのH鎖（特許文献 15 参照）とL鎖（特許文献 16 参照）およびセリシンのa成分（特許文献 17 参照）には正常なヒト皮膚由来の線維芽細胞を生育促進する作用のあることが分かった。

フィブロインのH鎖とL鎖がS-S結合した分子量37万および分子量40万のセリシンaを未分解絹タンパクという。

#### 【0006】

一方、絹糸は繊維として衣服以外の分野でも医療（手術用縫合糸）や化粧（パフ）等の分野で利用されている。

最近、このような繭や生糸の加工工程で絹タンパクの分子量は低下することが分かってきた。

また、繭糸や絹糸を粉末、フィルム、ゲル等に変える加工工程（特に繭糸や絹糸の溶解工程）においても絹タンパクの分子量は低下することが分かってきた（特許文献 18、19 参照）。

#### 【0007】

このような従来の絹加工工程で分子量が低下した絹タンパクの電気泳動像は分子量約1万から20万の間に1つのスメアー（S m e a r）でブロード（b r o a d）なバンドが見えるのみである。

分子量約5,000程度以下の絹タンパク分解物は、透析等の工程で除外されるため、加工工程における分子量低下はアミノ酸やペプチド程度にまで低下していると考えられる。ここでポリペプチドとはアミノ酸残基数30程度以上、ペプチドとはそれ未満を言う。

#### 【0008】

さらに、このようにして分子量が低下した絹タンパクは、ヒト細胞生育促進性

を低下することが分かってきた（特許文献14参照）。

絹フィブロイン、セリシンの細胞生育率は未分解の状態が最高の値を示し、平均分子量が20万程度に低下すると、細胞生育率は未分解時の約半分になり、分子量が2～4万に低下すると細胞生育性はほとんど示さなくなる。

このことは分子量低下とともに細胞生育阻害物質が生成していると考えられる。

#### 【0009】

絹タンパクの細胞生育阻害については、一般にタンパクは酸やアルカリ、光（紫外線、放射線等）、熱等でそのペプチド結合が複雑に、または不均一に切断されて低分子化すること、あるいはその際にアミノ酸残基側鎖の修飾（酸化、ハロゲン化、脱アミド化等）が起きること等のためと考えられる。

#### 【0010】

つまり、未分解フィブロイン、セリシンは細胞生育促進性が優れているにもかかわらず、絹加工工程における酸やアルカリ、光、熱等の処理で、不特定のペプチド結合切断による分子量低下とともに細胞生育阻害が増加している。

したがって、絹タンパクの細胞生育促進機能を利用するためには未分解の絹フィブロイン、セリシンあるいはフィブロインのH鎖（分子量約35万）、L鎖またはセリシンa（分子量約40万）等を利用することが好ましい。

#### 【0011】

しかし、絹タンパクを物性の面から見た場合、水溶液におけるフィブロインやセリシンは高分子量であるほど振動や攪拌時のずり（shear）により繊維化（結晶化）し易い性質を有している。

繊維化物は水不溶性の塊状物となる。

#### 【0012】

特に、未分解の絹タンパク（フィブロイン及びまたはセリシン）はずりが無くても水溶液の状態ですぐ（水を含んだゆるやかな結晶）化が起きやすい。

中性塩で溶解した分子量20万を超える絹タンパク溶液は脱塩途中にゲル化する。

ゲル化物も徐々に固くなり、また、ゲル化物を攪拌するとさらに固くなる。



このように僅かなずり (shear) によって容易に微細な繊維化が起きるので、軟膏や化粧品 (クリーム、乳液、化粧水等) としての使用感 (手触り、展延性) を低下させる原因となり、スキンケア素材には使えない。

#### 【0013】

例えば、未分解のフィブロイン水溶液または分子量約 30 万程度以上のフィブロイン水溶液を手の上で軽く摩擦しても容易に水不溶性で 0.5 ~ 2 mm 程度の塊状物が出現し、強く摩擦すると分子量 20 万程度以上でも塊状物が現れ、展延性に全く欠けている。

ところが、絹タンパクは分子量が低下するとともに、摩擦等による繊維化は起きなくなる。

#### 【0014】

特に絹タンパクの分子量が 20 万あるいはそれ以下、特に 5 ~ 10 万になると絹タンパク水溶液を強く摩擦しても繊維化した玉状の塊状物ができないため、化粧等の素材として物性面では優れた素材となる。

しかし、従来の繭加工で得られる絹織物等の絹糸においては、フィブロインの H 鎖は確認できないし、L 鎖はほとんど確認できない程度に分解している。

#### 【0015】

このようなフィブロインの細胞生育促進性は未分解フィブロインの約半分またはそれ以下である。

絹タンパクの細胞生育性に関する機能は未分解絹タンパクの 1/2 以下と、非常に低下してしまうが、フィブロインやセリシンは絹加工工程等で分子量が低下したまま使われてきたのである。

つまり、従来の絹フィブロインやセリシンの利用は、細胞生育性の観点よりも使いやすさ、使用感を主眼にして、分子量 20 万以下、主に分子量 10 万以下のものを使用してきたといえる。

#### 【0016】

##### 【特許文献 1】

特公昭 40-24920 号公報

##### 【特許文献 2】

特開昭 62-415 号公報

【特許文献 3】

特公平 1-44320 号公報

【特許文献 4】

特開平 1-254164 号公報

【特許文献 5】

特開平 1-256351 号公報

【特許文献 6】

特公平 4-202435 号公報

【特許文献 7】

特公平 5-83292 号公報

【特許文献 8】

特公平 6-4679 号公報

【特許文献 9】

特開平 8-143595 号公報

【特許文献 10】

特開平 11-139986 号公報

【特許文献 11】

特開平 11-276876 号公報

【特許文献 12】

特許第 2997758 号

【特許文献 13】

特許第 2990239 号

【特許文献 14】

特願 2002-230656 号

【特許文献 15】

特開 2001-163899 号公報

【特許文献 16】

特願 2001-180169 号 (W002/102845A1 国際公開公報)

## 【特許文献 17】

特開 2002-128691 号公報

## 【非特許文献 1】

H. Yamada 著: Materials Science & Engineering C, 14, P.41-46 (2001)

## 【非特許文献 2】

坪内紘三、山田弘生、高須陽子: 日本蚕糸学会誌、71 巻、1 号、P.1-5 (2002)

## 【0017】

## 【発明が解決しようとする課題】

本発明は、未分解絹フィブロイン、セリシンまたはフィブロイン H 鎖、L 鎖やセリシンの a 成分が有する優れた細胞生育促進性と、分子量 20 万以下のフィブロイン、セリシンが有する優れた手触り、展延性等とを併せ持つ絹タンパク由来ポリペプチド組成物を提供することを目的とする。

特に、上記の優れた特性を有する絹タンパク由来ポリペプチド水溶液を、医薬品、医薬部外品、化粧品などの素材や食品用素材等として利用することを目的とする。

## 【0018】

## 【課題を解決するための手段】

本発明者らは、先に、絹フィブロインの特定の部位のペプチド鎖に細胞生育促進機能があることを突きとめ、家蚕の絹タンパクの H 鎖を構成する N 末端部 (I)、非結晶部 (A) 及び C 末端部 (a) の各ペプチド鎖、並びに天蚕の絹フィブロインの非結晶部のペプチド鎖から選ばれる 1 又は 2 以上のペプチド鎖の特定のアミノ酸配列を有するペプチド鎖が細胞生育促進機能を有するものであるという知見を得ており、これを現在出願中である。

この知見から、上記細胞生育促進機能を有する特定のアミノ酸配列を有するペプチド鎖が残存してさえいれば、たとえ絹タンパクの分子量を 20 万未満に低下させても、細胞生育促進機能があまり低下することがないことを見出し、本発明を完成するに至ったものである。

## 【0019】

すなわち、本願の第 1 の発明は、(1) 家蚕又は天蚕由来の絹タンパク原料で

あって、該絹タンパク原料の平均分子量が20万以上であり、家蚕由来の絹タンパク原料の場合には、絹フィブロインのH鎖、L鎖及びセリシンaの少なくとも一部又は全部が分解しないで残存している絹タンパク原料を、中性塩水溶液に溶解し、(2)次いで、ペプチド結合切断物質を用いて処理し、絹タンパクの特異的アミノ酸残基間のペプチド結合を切断することを特徴とする、平均分子量が1万以上20未満であり、細胞生育促進性、展延性等にすぐれた絹タンパク由来の機能性ポリペプチド組成物の製造方法に存する。

#### 【0020】

本願の第2の発明は、絹タンパク原料が、家蚕又は天蚕の吐糸した繭糸、繭糸の加工物である生糸もしくは絹糸、絹織編物の未精練物、半精練物もしくは精練物から選ばれる1種以上からなる絹タンパク原料であることを特徴とする、上記第1の発明に記載の絹タンパク由来の機能性ポリペプチド組成物の製造方法に存する。

#### 【0021】

本願の第3の発明は、絹タンパク原料の中性塩水溶液を、ペプチド結合切断物質を用いて処理した後、得られたポリペプチド組成物を脱塩処理に付すことを特徴とする、上記第1の発明に記載の絹タンパク由来の機能性ポリペプチド組成物の製造方法に存する。

#### 【0022】

本願の第4の発明は、ペプチド結合切断物質が、酵素、ヒドロキシルアミンおよび希酸であること特徴とする、上記第1の発明に記載の絹タンパク由来の機能性ポリペプチド組成物の製造方法に存する。

本願の第5の発明は、ペプチド結合切断物質が、ヒドロキシルアミンであること特徴とする、請求項1記載の絹タンパク由来の機能性ポリペプチド組成物の製造方法に存する。

#### 【0023】

本願の第6の発明は、ペプチド結合切断物質が、リジルエンドペプチターゼ、キモトリプシン、パパイン、ペプシン、トリプシン及びサーモリシンから選ばれる酵素であることを特徴とする、請求項1記載の絹タンパク由来の機能性ポリペ

プチド組成物の製造方法に存する。

【0024】

本願の第7の発明は、特異的アミノ酸残基間のペプチド結合がAsn-Gly結合であることを特徴とする、請求項1記載の絹タンパク由来の機能性ポリペプチド組成物の製造方法に存する。

【0025】

本願の第8の発明は、平均分子量が1万以上20未満であり、細胞生育促進性、展延性等にすぐれた絹タンパク由来の機能性ポリペプチド組成物が、水溶液の形態であることを特徴とする、請求項1記載の機能性ポリペプチド組成物の製造方法に存する。

【0026】

本願の第9の発明は、(1)家蚕又は天蚕由来の絹タンパク原料であって、該絹タンパク原料の平均分子量が20万以上であり、家蚕由来の絹タンパク原料の場合には、絹フィブロインのH鎖、L鎖及びセリシンaの少なくとも一部又は全部が分解しないで残存している絹タンパク原料を、中性塩水溶液に溶解し、(2)次いで、ペプチド結合切断物質を用いて処理し、絹タンパクの特異的アミノ酸残基間のペプチド結合を切断した後、脱塩処理に付すことにより得られる平均分子量が1万以上20未満であり、細胞生育促進性、展延性等にすぐれた絹タンパク由来の機能性ポリペプチド水溶液に存する。

【0027】

本願の第10の発明は、(1)家蚕又は天蚕由来の絹タンパク原料であって、該絹タンパク原料の平均分子量が20万以上であり、家蚕由来の絹タンパク原料の場合には、絹フィブロインのH鎖、L鎖及びセリシンaの少なくとも一部又は全部が分解しないで残存している絹タンパク原料を、中性塩水溶液に溶解し、(2)次いで、ペプチド結合切断物質を用いて処理し、絹タンパクの特異的アミノ酸残基間のペプチド結合を切断した後、脱塩処理に付すことにより得られる平均分子量が1万以上20未満であり、細胞生育促進性、展延性等にすぐれた絹タンパク由来の機能性ポリペプチド水溶液を、(3)フィルム化、粉末化、ゲル化または乳化することにより、スキンケアのための医薬品、医薬部外品、化粧品用

素材として使用する方法に存する。

#### 【0028】

##### 【発明の実施の態様】

本発明の絹タンパク由来の機能性ポリペプチド組成物は、基本的に次の(1)～(3)の工程を経て製造される。

(1) 家蚕又は天蚕由来の未分解絹タンパク、又は平均分子量が20万以上であり、家蚕由来の絹フィブロインのH鎖、L鎖及びセリシンaの少なくとも一部又は全部が分解しないで残存している絹タンパク原料を、中性塩水溶液に溶解する。

(2) 次いで、上記絹タンパクの中性塩水溶液にペプチド結合切断物質(酵素、ヒドロキシルアミンおよび希酸)を添加して処理し、絹タンパクの特異的なアミノ酸残基間のペプチド結合(A s n - G l y 結合)を切断して平均分子量が1万以上20未満のポリペプチドに低分子化する。

(3) 平均分子量が1万以上20未満に低分子化したポリペプチドの中性塩水溶液を、脱塩処理に付して精製する。

得られたポリペプチド水溶液は、使用目的に応じ、フィルム状或いは粉末状に成形し、あるいはゲル状または乳化状等にして使用する。

#### 【0029】

本発明においては、絹タンパク原料と特異的なペプチド結合の切断条件が重要な要素であるので、先ずこの点について、以下に詳細に説明する。

絹タンパクの細胞生育促進性を利用するため、フィブロインのH鎖、L鎖およびセリシンa成分が残っている絹タンパクを原料とする。

このような絹タンパクをその特異的なアミノ酸残基間で切断して、絹タンパクの分子量を低下する。

つまり、このことは、絹タンパクにおけるペプチド結合の複雑な切断を起こさないこと、またはできるだけ起こさないことにある。

#### 【0030】

絹タンパクの切断が特異的なアミノ酸残基間で起きる酵素やその他の化学物質を使うことが好ましい。

一般に、タンパク分解酵素によるタンパクの切断は、穏和な条件下でおこなわれるため、アミノ酸残基側鎖の修飾が起こらないと言われている。

また、非特異的切断による断片の複雑化をさけることもできる。

したがって、アミノ酸あるいはそれに近い状態にまで分解することはほとんどない。

#### 【0031】

このような酵素には、

リジルエンドペプチターゼ、セリンプロテアーゼ、メタロエンドペプチターゼ、アルギニルエンドペプチターゼ、メタロプロテアーゼ、キモトリプシン、パパイイン、アルカラーゼ、ペプシン、レンニン、パンクレアチン、エラスターゼ、カルボキシペプチターゼ、アミノペプチターゼ、ジペプチターゼ等がある。

#### 【0032】

酵素の他にも化学物質によっては、特異性の高いポリペプチド鎖の切断法がある。

特異性の高い化学的切断法に使われる化学物質としては臭化シアン、N-ブロモスクシンイミド、BNP S-スカトール（2-(2-ニトロフェニルスルフェニル)-3-メチル-3-ブロモインドール）、ジメチルスルホキシド、O-ヨードソ安息香酸、ヒドロキシルアミン、希酸等がある。

#### 【0033】

通常の絹加工工程における低分子化は電気泳動像ではスメアーでブロードなバンドとなるが、酵素あるいは酵素以外の化学物質で切断され、低分子化した絹タンパクは、絹タンパクの構成成分以外にシャープなバンドが新たに確認できる。

好ましくはシャープなバンドが複数以上確認できる。

このようにして低分子化した絹タンパクは未分解絹タンパクの細胞生育性がほとんど維持される。

#### 【0034】

例えば、家蚕絹フィブロインのH鎖の分子量は約35万であるが、H鎖がその特異的なアミノ酸残基間で切断されれば、電気泳動像では新たにH鎖より低分子のバンドが元のH鎖と同程度にシャープなバンドとして複数現れる。

つまり、電気泳動像では、通常の繭加工工程で絹タンパクの分子量が低下した場合のようにスメアーでブロードなバンドのみが現れるのではなく、H鎖やL鎖と同程度にシャープなバンドとして1本、好ましくは複数（2本以上）現れることが重要である。

一般に、酵素の分子量は 10,000 程度以上である。

一方、ペプチド切断に特異性のある化学物質の分子量は 10,000 程度以下である。

#### 【0035】

絹タンパクのペプチド結合を切断するのに使う物質の分子量が低いことは、課題を解決するのにより好ましい。

例えば透析により絹タンパクと切断物質を分離する場合、切断された絹タンパク由来ポリペプチドの分子量は主に 10,000 程度以上であることから、切断物質の分子量が 10,000 程度以下であることは切断物質と切断された絹タンパク由来ポリペプチドとを分子量で容易に分離できる。

#### 【0036】

このような点から、酵素による切断より分子量 10,000 程度以下の物質で絹タンパクのペプチド結合を均一に切断することが好ましい。

ヒドロキシルアミン ( $\text{NH}_2\text{OH}$ ) や希酸は特に好ましい。

酵素は分子量約 10,000 以上であるが、酵素でペプチド結合切断後は、酵素を変性して、失活させればよい。

酵素はタンパク質であることから、例えば、高温（90℃程度）で処理して変性させる。その方法は各酵素によって多少異なるが、失活した酵素が絹タンパク由来ポリペプチドに含まれていても、スキンケア素材としての機能には問題ない。

#### 【0037】

次に、このように絹タンパクのペプチド結合を特異的なアミノ酸残基間で切断し、その水溶液が摩擦や振動等によるずりによっても塊状物が現れないようにするには、平均分子量は 20 万以下がよい。

15～20 万ではゆるやかなずりでは塊状物はほとんど現れない。さらに好ま



しくは15万以下がよい。

分子量1～15万では強いずりでもほとんど塊状物は現れない。

#### 【0038】

一方、切断された絹タンパク由来ポリペプチド水溶液のゲル化が透析後に効率よく起きるため、また非結晶性フィルムを作りやすく、さらにそのフィルムが強度や柔軟性を有するためには、分子量は1万以上、好ましくは4万以上がよい。

#### 【0039】

そこで、本発明ではペプチド結合の酵素切断法や化学的切断法を用いて、フィブロインのH鎖、L鎖およびセリシンのa成分が有している細胞生育促進機能を損なうことなく、絹タンパクの分子量を1～20万、好ましくは4～15万に低下し、その水溶液に摩擦等のずりを加えても塊状物の出現しない手触りに優れた絹タンパク由来ポリペプチド水溶液を製造し、スキンケア素材として利用する。

また、これを粉末化、フィルム化、ゲル化等を行い、また乳化を行い創傷被覆剤、化粧用素材として提供する。

#### 【0040】

ペプチド結合の切断は中性塩が存在する溶解物、あるいは溶解物の透析過程または透析後のいずれの段階で行ってもよい。

絹タンパクが溶解状態（溶液中で絹タンパクは非結晶性、あるいはアモルファス状態）であるときに、ペプチド結合切断物質を作用させることが好ましい。

また、切断物質は複数作用させてもよい。

切断物質として酵素を使う場合は切断後に酵素を失活する事が好ましい。

以上の方法を以下に詳しく述べる。

#### 【0041】

##### A. 原料

一般に蚕は体内の絹糸腺腔に絹を分泌し、この絹は液状絹と言われる。

家蚕の液状絹はフィブロインとセリシンから成り（これらを絹タンパクという。）、家蚕の液状フィブロインは分子量約37万である[(Tasiro Yutaka and Otsuki Eiichi, Journal of Cell Biology, Vol,46,P1(1970))]

これを未分解フィブロインという。

また、分子量約 37 万のフィブロインは分子量約 35 万（H鎖）と約 2.5 万（L鎖）に分けられる。

#### 【0042】

セリシンは 4 成分から成り、細胞生育促進性に優れた a 成分の分子量は 40 万である（特許文献 18 参照）。

この分子量のセリシンを未分解セリシンという。

また、セリシンを主に、あるいは 99% 以上セリシンから成る繭を作るセリシン蚕（例えばセリシンホープ）の繭糸も原料とできる。

セリシン蚕は家蚕の突然変異体であるが、正常体と突然変異体のセリシンタンパクには差がない。

#### 【0043】

一方、野蚕の絹タンパクも原料とすることができる。

野蚕としてはクリクラ蚕、エリ蚕、サク蚕（インドサク蚕等も含む）、天蚕等、*Antheraea* に属するものは同様の絹タンパク成分から成っている。

例えばクリクラ蚕の絹タンパク [H. Yamada and K. Tsubouchi, *International Journal of wild Silkmoth & Silk*, Vol.6, P.47-51(2001)] はフィブロインは約 18 万の分子量のものが S-S 結合し、35 万の分子量としての物性を示す。

#### 【0044】

一方、セリシンは約 40 万の分子量から成っている。

蚕は営繭時に液状絹を吐糸して繭（繭糸と蛹で構成）を作る。

繭糸には中心部にフィブロイン、周囲にセリシンが存在し、存在比は（70～80% フィブロイン）：20～30%（セリシン）であることが知られている。

#### 【0045】

生糸は繭糸を数本から数 10 本集合して作られる。

生糸で織った織物を生織という。

本発明の原料物質は繭糸、生糸、絹糸織編物、絹糸（フィブロイン繊維）、それらの残糸またはそれらの未精練物、半精練物、精練物、およびそれらを原料とした繊維、粉末、フィルム等、家蚕および野蚕等の絹糸虫類が吐糸する蛋白質繊維すべてを対象とすることができる。

## 【0046】

しかし、これらの原料には家蚕のフィブロインH鎖、セリシンのaまたはそれらに相当する成分等の一部が未分解の状態で存在する必要がある。

H鎖やa成分の確認は電気泳動像で、それぞれに相当するバンドの存在を確認することで行う。

そのため原料絹タンパクの分子量（重量平均）は20万を超えるものを使用する。

## 【0047】

繭糸、生糸又は生織からセリシンを除去する工程を精練といい、精練後の繊維が、絹糸又はフィブロイン繊維である。

ただし、セリシン蚕繭の精練は行わない。

絹糸は、まず、養蚕農家で生産された繭を乾繭、煮繭後に繰糸して生糸を作製し、次いで、生糸又は生織の精練を行い、絹糸また絹織物とする。

これらの工程で生じる屑が残糸である。

## 【0048】

乾繭は繭を115～120℃の温度から5～6時間かけて80℃程度の温度に徐々に下げて行う。

煮繭では100～105℃の水蒸気及び熱水で約10分間処理され、繭を熱水で満たす。

このような従来の生糸生産工程（繭加工）を経るとフィブロインのH鎖の半分程度以上は分解されてしまう。

## 【0049】

## B. 精練

精練は原料からセリシンを除くために行い、その方法としては、アルカリ性ナトリウム塩や石鹼を含む水溶液中で煮沸する場合（アルカリセッケン精練）が最も一般的な方法である。

その他、アルカリ性ナトリウム塩のみで精練する場合（アルカリ精練）、加圧熱水（例えば120℃の熱水）に浸漬して精練する場合（高圧精練）、酵素で精練する場合（酵素精練）等がある。

## 【0050】

水のみで煮沸精練する場合もあるが、セリシンの残留が多く一般的ではない。このような精練によって絹糸を得る。

しかし、生糸を一般的なアルカリセッケン精練する場合（例えば炭酸ナトリウム 0.05% 水溶液、95～99℃で2時間）、フィブロインのH鎖、L鎖はほとんど分解され、分子量は約5～10万に低下している。

## 【0051】

以上のような従来の繭加工処理により絹タンパクのペプチド結合が不均一に切断されて、分子量低下することは、絹タンパクの細胞生育促進性の低下となるので、本発明では従来のような処理による分子量低下は避ける必要がある。

精練を行っていない場合は未精練、精練が完全でない場合は半精練といわれる。半精練で得られた物も通常は絹糸というが、フィブロイン繊維とはいわない。

ここでは99%以上フィブロインである場合をフィブロイン繊維という。

これらも繭加工工程の一部である。

## 【0052】

本発明において、原料を精練する時に用いるアルカリ水溶液としては、炭酸ナトリウム、炭酸水素ナトリウム、ケイ酸ナトリウム、メタケイ酸ナトリウム、リン酸ナトリウム、水酸化ナトリウム等のアルカリ性ナトリウム塩の水溶液が挙げられる。

アルカリ精練の場合、炭酸ナトリウム水溶液は適度なバッファー効果があるため、好ましい。

## 【0053】

また、本発明における精練ではセリシンが残留してもよい。

これは半精練や未精練に相当する。

また、セリシンの比率を増加するためにセリシン蚕繭糸を溶解の時に加えてもよい。

重要なことはフィブロインのH鎖やセリシンのa成分が原料に残っていることである。

したがって、セリシンの残留している原料を得るためにはセリシンのa成分が

残るような温和な精練を行う（特許文献17参照）。

#### 【0054】

温和な精練として例えば繭糸を中性付近の水（pH 6～8）に1時間程度、煮沸浸漬するか、これに相当する処理を行う。

例えば、炭酸ナトリウムを使う場合は濃度を0.05%程度とし、10分程度よく攪拌しながら煮沸する。

一方、セリシンをほとんど除く場合（99%以上フィブロイン）は、フィブロインのH鎖ができるだけ分解しないで残るような精練を行う（特許文献15参照）。

例えば、繭糸を0.05%炭酸ソーダ水溶液で煮沸精練する場合は、精練時間は30分程度以内、好ましくは約10分以内で行う。

他の場合は、これに相当する条件で行う。

#### 【0055】

### C. 原料の溶解

本発明の絹タンパク由来ポリペプチドは上記の原料を以下のように溶解して得る。

原料絹糸の溶解剤である中性塩としては、例えば塩化カルシウム、銅エチレンジアミン、チオシアン酸ナトリウム、チオシアン酸リチウム、臭化リチウム、硝酸マグネシウム等の中性塩が挙げられる。

当該中性塩においても飽和水溶液又は50%〔重量(g)/容量(mL)〕飽和以上の濃度が好ましい。

フィブロインとセリシンが含まれている場合、例えば繭糸や未精練物、半精練等は上記中性塩で絹糸と同様に溶解する。

#### 【0056】

一方、セリシン蚕繭糸のようにセリシンが98%以上の場合は8M尿素で、70～90℃、10分程度以内で溶解する。

あるいは7M以上の濃度の臭化リチウムで45℃の場合は20分程度以内で溶解する。

原料を中性塩溶液に溶解する工程では、中性塩にメチルアルコール、エチルア

ルコール、プロピルアルコール等のアルコールを添加してもよい。

【0057】

中性塩として塩化カルシウムを使う場合は94℃以下の温度で、望ましくは75～85℃程度の温度で行う。

【0058】

臭化リチウムを使う場合は50℃程度以下の温度で原料を溶解する等、中性塩によって溶解条件は異なるが、フィブロインのH鎖、セリシンのa成分が残るような、または分子量が20万以上となるような溶解方法を行う。

【0059】

この場合、

- 1) 攪拌することにより溶解を促進することができる。
- 2) 溶解温度が低いと溶解しにくい。
- 3) 溶解温度が高いと溶解し易いが、分子量低下が激しく起きる。

【0060】

原料を中性塩で溶解した溶解液には、フィブロインあるいはフィブロインとセリシンの混合物のほかに中性塩、アルコール等が含まれている。

この溶解液から、まず不溶物を除去し、次いで透析膜や透析装置を用いて分子量約1万以下を除外する。

ただし、分子量約1万で分離する透析膜を用いても、分子の形にもよるが、分子量5,000前後のものも分離されないで残る場合がある。

このような透析によって絹タンパク水溶液を得る。

この絹タンパク水溶液には、中性塩が0.001～0.2M程度残されていてよい。

【0061】

D. ペプチド結合の切断

中性塩等の溶解剤で絹タンパクが溶解している溶解液に、ペプチド結合を特異的に切断する物質を添加することでペプチド結合の切断を行う。

この場合、複数の切断物質を使ってもよい。

切断物質としては酵素、希酸やヒドロキシルアミン等の化学物質を使う。

希酸としては 2 N 以下の塩酸や硫酸でもよいが、ギ酸が好ましい。

ヒドロキシルアミンを使う場合は、0.1 ~ 3 M となるように添加する。

この場合、ヒドロキシルアミンが希薄であると、ペプチド結合の切断が起きる場合や起きない場合があり、切断が均一にならない。

高濃度であるとペプチド結合切断の特異性が乱れる。

#### 【0062】

切断条件としては、アルカリ（例えば 1 N NaOH）で溶解液を pH 9 程度（pH 8.0 ~ pH 10.0）にし、約 45℃（30 ~ 50℃）で 4 時間（30 ~ 6 時間、好ましくは 3 ~ 5 時間）処理して、絹タンパクのアスパラギン（Asn）-グリシン（Gly）のペプチド結合の切断を行う。

切断処理後は反応を止めるため、希酸（例えばギ酸）で pH 2 ~ 3 とする。

以上によって、絹タンパクの Asn-Gly 間で特異的に切断されたいくつかのポリペプチド断片が得られる。

#### 【0063】

ところで、絹フィブロインの前駆体（Precursor）タンパクとしてのアミノ酸配列は、H鎖の場合はジーンバンク No. P05790、L鎖の場合はジーンバンク No. P21828 として登録されている。

これによれば、H鎖は 5307 残基、L鎖は 244 残基から成っている。

#### 【0064】

H鎖は特にグリシン（G）、アラニン（A）、セリン（S）を中心とした結晶部と言われる部分とそれ以外のアミノ酸残基が多い非結晶部と言われる部分との繰り返しから成っている。

H鎖に占める結晶部の領域は非常に大きく、結晶部を比較的結晶性の高い部分と比較的結晶性の低い部分に分けている場合もあるが、いずれも（G-X）の繰り返し为主であるので（この場合の X は主に Ala、Ser、Tyr、Val が主である）、ここでは区別しないで結晶部と考えている。

#### 【0065】

非結晶部のアミノ酸残基数は 28 ~ 32 で、H鎖に 11 ケ所の非結晶部があり、その内の 8 ケ所に Asn-Gly 結合が存在する。

したがって、前駆体のフィブロインが正確に 8ヶ所の A s n - G l y 結合で切断されれば、計算上はアミノ酸残基数が 692, 1013, 639, 539, 391, 351, 607, 118 の 9断片の集合となる。

#### 【0066】

ただし、前駆体フィブロインの N 末端側にあるイニシアルペプチドは、どのアミノ酸残基まで繭糸タンパクとなっているかは分かっていない。

また、C 末端側の断片のアミノ酸残基数 118 は L 鎖と S - S 結合している。

したがって、A s n - G l y で 100% 切断されたとしても、切断された 9 残基の内の 692 の残基数はさらに少ない残基数となり、118 の残基数はさらに多くの残基数となる。

#### 【0067】

これらの断片はアミノ酸 1 残基の分子量を約 110 とすれば、各断片の分子量は主に約 4 万 ~ 10 万の範囲に入り、電気泳動像ではその間に 9 本のシャープなバンドとなる。

しかし、すべての A s n - G l y 結合が 100% 切断しなくても、50% あるいはそれ以上切断された結果、絹タンパクを構成する各成分以外に構成成分と同程度にシャープなバンドが電気泳動像で 1 本以上あり、平均分子量が 1 ~ 20 万となればよい。

#### 【0068】

酵素によるペプチド結合の切断では、リジルエンドペプチターゼ、キモトリプシン、パパイン、ペプシン、トリプシン、サーモリシン等が好ましい。

リジルエンドペプチターゼ (L y s y l E n d o p e p t i d a s e) の場合はリジン残基のカルボキシル基側のペプチド結合を特異的に切断する。

絹タンパクは水溶液の状態、あるいは 4 M 以下のウレア水溶液に溶解中に酵素処理する。

#### 【0069】

酵素は絹タンパクの 1% (重量) を添加し、30 ~ 40℃、pH 8.0 ~ 10、30 分間 ~ 4 時間処理する。

また、この酵素 (リシルエンドペプチターゼ) は 50℃ 以上でかなり不安定と



なり、70℃以上では失活する。

#### 【0070】

絹タンパクのペプチド結合切断において重要な点は

- 1) 切断された絹タンパク断片が未分解絹タンパクの優れた細胞生育促進性を残していること、つまり、絹フィブロイン、セリシン由来のポリペプチドの細胞生育率はそれぞれ未分解フィブロイン、未分解セリシンの細胞生育率の50%以上であること、
- 2) その水溶液は摩擦等のずりによっても塊状物が生じないこと、
- 3) その水溶液を静置しておく数日(1~7日間)以内にゲル化すること、である。

#### 【0071】

そのためには、切断による断片全体の分子量が主に1~20万の間となり、電気泳動像で分子量20万以下に、未分解絹タンパクを構成する各成分とは別のシャープなバンドが確認できることである。

#### 【0072】

E. 絹タンパク由来ポリペプチド水溶液の作成

ペプチド結合の切断処理後、この溶解液から絹タンパク由来ポリペプチド以外の物を脱塩等で除外する。

酵素でペプチド結合を切断した場合は、脱塩後の絹タンパク由来ポリペプチド水溶液を70~90℃にすることで失活させる。

#### 【0073】

脱塩はカラム(Sephadex G-25)で行ってもよい。

水で透析する場合、透析は溶解液の約50倍量の水を透析外液として2~4時間毎に、水を4回以上変えるか、これに相当する方法を用いて透析する。

このようにして、絹タンパクが低分子化されても未分解絹タンパクの優れた細胞生育促進性を残し、しかもそのポリペプチド水溶液はずりによっても容易に塊状物を生じない、絹タンパク由来のポリペプチド水溶液が得られる。

#### 【0074】

ペプチド結合の切断は脱塩の途中の絹タンパク溶解液に切断物質を添加しても

よい。

また、脱塩後の絹タンパク水溶液に切断物質を添加してもよい。

切断方法は切断物質によって異なるが、いづれにしても切断後に、塩や切断物質（希酸や $\text{NH}_2\text{OH}$ ）等を透析等で除く必要がある。酵素切断の場合は酵素を失活させたほうが好ましい。

脱塩の判定は透析外液の一部に硝酸銀を一滴加え、滴下部分がほとんど白色にならなくなった時点で脱塩されたとした。

#### 【0075】

#### F. フィルム、粉末、ゲルの製造

非結晶性状態で溶解している絹タンパク由来のポリペプチド水溶液からフィルム、粉末、ゲル等を作る。

得られたフィルム、粉末、ゲル等はスキンケア用の素材として使用する。

#### 【0076】

##### 1) フィルム化

ペプチド結合切断物質で絹タンパクの特異的なペプチド結合が切断された前記 E. のポリペプチド水溶液を平板上に流し、送風しながら乾燥すればフィルムとして得られる。

ポリペプチド水溶液の濃度、または平板状に流す時の単位面積当たりのポリペプチド水溶液量等を変えることでフィルムの厚さを変えることができる。

非結晶性のフィルムとするにはフィルムの厚さが $60\text{ }\mu\text{m}$ 程度以下となるようにする。

厚くなると乾燥に時間がかかり結晶化する。

#### 【0077】

特に、非結晶性フィルムは創傷被覆材等のスキンケア素材として優れている。

一方、結晶化してもよいが、結晶化したフィルムは創傷被覆材としては使えない。

このようにして得た非結晶性フィルムや結晶化したフィルムを粉碎すれば、絹タンパク由来ポリペプチドの非結晶性粉末や結晶性粉末となる。

#### 【0078】

## 2) 粉末化

前記F. 1) のフィルムを粉碎するだけでなく、前記E. のポリペプチド水溶液をスプレードライ、凍結乾燥後に粉碎、攪拌やアルコール添加、凍結処理等で沈澱させた後に乾燥、粉碎等によって非結晶性の粉末が得られる。

### 【0079】

## 3) ゲル化

ゲル化は、絹タンパク由来ポリペプチド水溶液をそのまま放置（静置）して行うことが好ましい。

ポリペプチドの水性ゲルは、ポリペプチド濃度が一定以上になると、ポリペプチド鎖と近隣の他のポリペプチド鎖との間で水素結合をつくり、水を含有し、緩く絡み合って三次元網目状を形成することにより出現するものと推定される。

ゲル化は多くの水を含んだポリペプチドの結晶( $\beta$ )化であり、水性ゲルと考えられる。

### 【0080】

この水性ゲルは非常に脆い状態であるために、外力で容易にゲル状態は壊れる。

このようなゲルの一部は攪拌によって、一部は水に溶解する性質があり、これを水性ゲルという。

水性ゲルを作るため、絹タンパク由来ポリペプチド水溶液をそのまま静置する場合、室温（30℃程度以下）より温度を高くするとゲル化は促進されるが、100℃以上では分子量低下が起きやすい。

また、沸騰させることはポリペプチドにずりが加わるために避けた方がよい。

### 【0081】

ゲル化温度としては40～90℃、好ましくは50～80℃がよい。

また、絹タンパク由来ポリペプチド水溶液の濃度が高いほどゲル化は早いので、0.1%以上、好ましくは3%以上がよい。

一方、濃度は20%以上にはできない。

### 【0082】

それは、原料の溶解、ペプチド結合の切断、脱塩等の工程で液体状態とならな

いため、効率的に工程を進めることができないからである。

ポリペプチド水溶液の濃度は0.1～15%、好ましくは3～10%がよい。

絹タンパク由来ポリペプチド水溶液の水性ゲルは、例えば等電点法やポリペプチド水溶液のポリペプチドの結晶化をわずかに促進する方法等によっても得ることができるが、スキンケア素材として利用するには、そのまま静置でゲル化することが好ましい。

#### 【0083】

G. 絹タンパク由来ポリペプチド水溶液またはその水性ゲルの乳化

上記ポリペプチド水溶液およびその水性ゲルの乳化は、それらの油成分を加えて攪拌することで可能となる。

乳化に用いる油性分としてはオリーブ油、椿油、アボガド油、カカオ油、サンフラワー油、パーシック油、パーム油、ヒマシ油等の植物性油やその他動物性油、さらにホホバ油、ミツロウ等のロウ類等、化粧品原料基準に収載されている油やロウ等の油性分を使用する。

油性分の種類によって乳化物の性状に大差はない。

#### 【0084】

1) 絹タンパク由来ポリペプチド水溶液の乳化

絹タンパク由来ポリペプチド水溶液は乳化剤として使えることが分かった。

その乳化においては、ポリペプチド水溶液の濃度と量に対する油性分の割合を適宜調製することにより目的とする乳化物を作成する。

ポリペプチド水溶液と油性分を混合し、乳化させる方法としては攪拌法、すりませ法などがあるが、いずれでもよい。

#### 【0085】

乳化用の機械はポリペプチド水溶液の濃度や油の割合によって使い分けることが望ましい。

乳化物の粘性は絹タンパク由来ポリペプチド水溶液の濃度によって変わる。

ポリペプチド水溶液の濃度が薄いとポリペプチドによる細胞生育性が低い。

したがって、乳化のためのポリペプチド水溶液の濃度は0.1%以上、好ましくは0.5%以上である。

一方、ポリペプチド水溶液の濃度が高いと皮膚上での伸び（延展性）が低下し、使用感が低下する。

従って、その濃度は 15% 以下、好ましくは 10% 以下がよい。

#### 【0086】

乳化物は絹タンパク由来ポリペプチド水溶液の濃度が低い（3%程度以下）場合は液状となるので、乳液として使える。

ポリペプチド水溶液の濃度が高くなる（3%程度以上）に従って、粘性を帯びクリームや軟膏として使える。

ポリペプチド水溶液の濃度が低いと細胞生育率が低いこと、ポリペプチド水溶液の濃度が高いと伸びが低下することなどは、次に述べる水性ゲルの乳化の場合にも同様である。

#### 【0087】

##### 2) ポリペプチド水性ゲルの乳化

絹タンパク由来のポリペプチド水性ゲルは油性分と混合するとき、乳化剤として作用することが分かった。

#### 【0088】

乳化方法は、前記 1) ポリペプチド水溶液の乳化の場合と同じである。

ゲルにおけるポリペプチドの濃度が 6%程度以上になると、ゲルと油性分を混合し、これを攪拌することは難しくなる。

濃度が濃くなるにつれて、攪拌時に水を添加すると攪拌しやすく、乳化は容易となる。

水はポリペプチドと等量から 2 倍程度の量が必要である。

つまり、濃度 10% のゲル 100 g には 5 ～ 20 g の水を添加して攪拌するとよい。

#### 【0089】

ポリペプチド水溶液による乳化の場合と比べて、ポリペプチド水溶液をゲル化した後に乳化することは、ゲル化の工程が多く、工業的には不利である。

しかし、ポリペプチドの水性ゲルを乳化する場合には、ポリペプチド水溶液の場合より油性分の割合が少なくても乳化することができるという利点がある。

すなわち、同じ含水率の場合、ポリペプチドの水溶液より水性ゲルを用いた方が油性分とポリペプチドの割合を広範囲に変えることができるため、性質の違う乳化物を得ることができるという利点がある。

この理由は、ポリペプチド水溶液のゲル化によってポリペプチドはすでに分子間でゆるく結合しているため、すべてのポリペプチド鎖が油性分と結合しなくてもよいことによるものと推定される。

#### 【0090】

本発明の絹タンパク由来ポリペプチドの乳化物には、本発明の作用・効果を損なわない範囲で、必要に応じて、pH調整剤、防腐剤、増粘剤、保湿剤、殺菌剤、抗炎症剤、色素、香料、酸化防止剤、紫外線吸収剤、ビタミン、有機もしくは無機の粉体、アルコール、糖類等、軟膏や化粧料等にスキンケア用として通常に使用される成分を適宜配合することができるこというまでもない。

#### 【0091】

#### H. 絹タンパク由来ポリペプチドの利用

未分解絹タンパクの優れた細胞生育促進性を残した絹タンパク由来のポリペプチドが上記の方法で水溶液、フィルム、粉末、ゲルおよび乳化物の状態で得られる。

これらは皮膚細胞を生き生きとし、生育を促進することから、特に次のような利用に効果的である。

#### 【0092】

##### (1) コーティング材

細胞生育促進性の低下した絹（例えばアルカリ処理で得られる結晶性絹粉末）、およびその他の素材（例えばタルク等の体質粉体、およびセラミック粉末等の有機、無機粉体、さらに眼鏡、時計、指輪、ピアス、注射針など、生体に接触する部分や生体に接触する手術用器具などの医療器具）のコーティング材として使用できる。

#### 【0093】

コーティング材として使用する場合は、絹タンパク由来ポリペプチド水溶液にこれらの素材を浸漬することで、それらの表面に絹タンパク由来ポリペプチドを

被膜し、素材本来の特性に細胞生育促進性の機能を加えて、素材の改質を行う。

このような機能を付与するための膜厚としては0.01～3m $\mu$ 、好ましくは0.1～1m $\mu$ である。

#### 【0094】

また、絹タンパク由来ポリペプチドの付着性を上げるため、コーティングにバインダーを用いてもよい。

このようにして得た改質粉末はボディパウダーやファンデーションとしても優れている。

またピアス、注射針などでは皮膚など生体の炎症を抑えることができる。

#### 【0095】

##### (2) フィルム

非結晶性フィルムは水や消毒液等を吸収して、溶解あるいは一部溶解することから、単独で、あるいは布帛やフィルムと複合し、スキンケア素材として、あるいは創傷被覆剤として利用できる。

また、皮膚上で水分を吸収した非結晶性フィルムは体温等で水分を放散して10～30分程度で乾燥する。

乾燥したフィルムには皮膚表面上の不要な油、ゴミ等を含んでいるので、フェースマスク等に利用すると皮膚表面のミクロな不要物まで除去できる。

#### 【0096】

##### (3) 粉末

前記の改質粉末やフィルムを粉碎して得られた粉末はスキンケア用粉末として、創傷治療用や化粧用に単独で、また、他の創傷治癒剤や化粧料に添加して用いる。

#### 【0097】

##### (4) ゲル

食品に添加して、またはゲル化剤やゲル状食品に添加して用いる。

#### 【0098】

##### (5) 乳化物

スキンケア用の創傷治癒剤や化粧用に単独であるいは添加剤として用いる。

特に、軟膏やクリーム、乳液、化粧水用の素材として、本発明の絹タンパク由来ポリペプチドの乳化物は皮膚細胞の生育促進に、また手触りや付着性、伸びに優れている。

#### 【0099】

乳化物として利用する場合の絹タンパク由来ポリペプチド、油性分、水の重量割合は絹タンパク由来ポリペプチドの濃度が1%の時、油性分は1%～20%、水は80%～90%の範囲で、好ましくは油性分3%～45%、水55%～97%の範囲で、さらに好ましくは油性分7%～30%、水70%～93%の範囲で混合する。

#### 【0100】

絹タンパク由来ポリペプチドの濃度が10%のとき、油性分15%～50%、水50%～85%の範囲で、好ましくは油性分20%～35%、水75%～80%の範囲で混合する。

その他の割合はこれらの配合率から適宜決めることができる。

これらの配合割合は特願2001-364489（特許文献14参照）とほぼ同様である。

#### 【0101】

しかし、本発明の絹タンパク由来ポリペプチドの細胞生育率は未分解フィブロインの50%以上、主に75%以上である。

一方、先述の特願2001-364489の細胞生育率は未分解フィブロインの50%未満であり、本発明は細胞生育性に優れている。

#### 【0102】

本発明の乳化物を使用して製造することができる乳化化粧料または医薬部外品としては、例えば、清浄用化粧品（化粧石けん、洗顔料、シャンプー、リンス等）・頭髮化粧品（染毛料、頭髮用化粧品等）・基礎化粧品（一般クリーム・乳液、ひげそり用クリーム、化粧水・オーデコロン、ひげそり用ローション、化粧油、パック等）・メイクアップ化粧品（ファンデーション、眉墨、アイクリーム・アイシャドウ・マスカラ等）・芳香化粧品（香水等）・日焼け・日焼け止め化粧品（日焼け・日焼け止めクリーム、日焼け・日焼け止めローション、日焼け・日



焼け止めオイル等)・爪化粧品(爪クリーム等)・アイライナー化粧品(アイライナー等)・口唇化粧品(口紅・リップクリーム等)・口腔化粧品(歯みがき等)・入浴用化粧品(浴用化粧品等)等が挙げられる。

また、医薬品としては軟膏のような創傷被覆剤として使用できる。

#### 【0103】

##### 【実施例1】

絹タンパクにおける A s n - G l y 結合のヒドロキシアミン( $\text{NH}_2\text{OH}$ )による切断と切断物の電気泳動像と平均分子量測定

家蚕が営繭して1週間後の生繭を原料とした。これを「試料1」とする。

また、この生繭の繭層(100g)を4,000gの8M尿素、80℃に7分浸漬、精練した。

この間よく攪拌してセリシンを除いた。

この間の重量減(練減)は24.7%であった。

セリシン残留度を調べるため、この精練繭層を炭酸ソーダ0.05%の水溶液4,000g中で60分煮沸したところ練減は0.7%であった。

その結果8M尿素で精練して得た繭層は99%以上がフィブロイン繊維(絹糸)と考えられる。

これを「試料2」とする。

#### 【0104】

次に、8M尿素で精練して得た絹糸の内の15gを9M LiSCN 200mlに入れ室温(25℃)で溶解した。

この溶解液に50%ヒドロキシルアミン約30mlを入れ、次いで1N NaOHを約6mlをいれてpH9とし、溶解液を45℃に上げ、4時間置いた。

その後、溶解液に99%ギ酸16mlを加え、溶解液をpH2にしてヒドロキシルアミンによる A s n - G l y 結合切断を止め、この溶解液を水(室温)で透析した。

透析膜はUC36-32-100(三光純薬株式会社製)を用い、溶解液の100倍量の水を透析外液とし、3時間ごとに5回水を変えて透析した。

この間水をよく攪拌した。

得られたフィブロイン由来ポリペプチドを「試料3」とする。

#### 【0105】

一方、前記と同様に8M尿素で精練して得た絹糸の内の15gを9M LiSCN 200mlに入れ、室温で溶解した。

この溶解液を透析膜に入れ水で透析した。得られたフィブロイン水溶液に、前記と同様に50%ヒドロキシルアミン約30mlを入れ、次いで1N NaOHでpH9とした。

この溶解液を45℃に4時間置き、ギ酸でpH2とした後に水で透析した。

ここで得られたフィブロイン由来ポリペプチドを「試料4」とする。

#### 【0106】

試料2～試料4を9M LiSCNに溶解後、8M尿素で置換し、2-メルカプトエタノールでS-S結合を切断して電気泳動用試料とした。

絹タンパクのAsn-Gly結合が切断された断片の分子量は次のように電気泳動像とゲルクロマトグラフィーカラムを用いて測定した。

電気泳動用のゲルは2-15%のアクリルアミドグラジェンドゲルを用い、電気泳動後のゲルはCBB（染色液）で染色し、電気泳動像におけるバンドを、対照のマーカの分子量と比較しながら観察した。

#### 【0107】

その電気泳動像を図1に示す。

図1の試料2にはフィブロインのH鎖、L鎖のバンドが明確に認められる。試料3にはH鎖、L鎖のバンドが認められず、H鎖やL鎖と異なる分子量の部分で、H鎖やL鎖と同程度にシャープないくつかのバンドが認められる。

通常の繭加工工程、例えば絹糸を炭酸ソーダ等で精練した場合、また絹糸を塩化カルシウムのような中性塩で溶解した場合等の電気泳動像はスメアーでブロードなバンドのみで、試料3の電気泳動像とは異なる。

#### 【0108】

試料3には明確には7つのバンドが確認され、分子量の大きい方から各バンドはほぼ140、85、75、35、24、22および9kDaに相当する。

その他に分子量20万以下にスメアーでブロードなバンドがわずかに認められ

るが、試料3の電気泳動像から、フィブロインにおけるA s n - G l yの結合はほぼ切断されている。

#### 【0109】

一方、試料4は試料3に比べて、A s n - G l yの切断によるバンドが明確ではないが85および9 k D aのバンドが認められる。

試料3と試料4の電気泳動像からA s n - G l y結合のヒドロキシルアミンによる切断は、絹糸の溶解剤としてL i S C Nを使う場合、絹タンパクがL i S C Nで溶解中に行う方がより均一に切断されることがわかる。

分子量測定はゲルクロマトグラフィーカラム (S u p e r d e x 200 P r e p g r a d eファルマシア) を用い、試料を8M尿素／40mM T r i s - H<sub>2</sub>S O<sub>4</sub> (p H 8) で溶出し (0.6 m l / m i n) 、275 n mでモニターした。

その重量平均分子量の結果を表1に示す。

#### 【0110】

試料2～試料4を9 M L i S C Nに溶解後、透析膜に入れ、水で透析して得た絹タンパクまたは絹タンパク由来ポリペプチド水溶液を手にとって摩擦すると、試料2の水溶液は玉状の塊状物ができたが、試料3と試料4の水溶液は玉はできず、手触りに優れていた。

#### 【0111】

【表1】

各試料の分子量

試 料	分子量
試料2	305,000
試料3	167,000
試料4	45,000

#### 【0112】

## 【実施例 2】

絹タンパク由来ポリペプチドの細胞生育性

【実施例 1】の試料 1～試料 4 の細胞生育性を次のように測定した。

まず、各試料を細胞培養容器へ次のようにコートした。

各試料 0.01 g を 9 M LiSCN 1 ml に溶解し、溶解液を 50 倍量の水で 4 回透析し、各試料の水溶液とした。

各試料の水溶液の 0.0025 % 溶液 1 ml を細胞培養用のシャーレ (35 mm  $\phi$ 、ファルコン) に入れ、風乾し、PBS 2 ml で 3 回洗ったのち再度風乾し、70 % エタノールで浸漬して滅菌した。

## 【0113】

細胞は、ヒト皮膚線維芽細胞 (クラボウ株式会社製) を使用した。

培地は、皮膚線維芽細胞増殖用低血清培地 (クラボウ株式会社製, Medium 106 S 500 ml に LSGS 10 ml を添加) を使用した。

培養は試料をコートしたシャーレ 1 枚につき培地 2 ml を入れ、7 万の細胞を接種して 3 日間培養した。

細胞数の測定はシャーレ 1 枚につき培地 2 ml、アラマブルー (IWAKI) 0.1 ml を入れ、37℃で 2 時間培養後に 570 nm、600 nm の吸光度から計算した色素の還元量を細胞生育数とした。

## 【0114】

試料をコートしなかったシャーレの細胞生育数を対照区 (100%) とし、試料をコートしたシャーレの細胞生育率を表 2 に示した。

表 2 において、試料 1、試料 2、試料 3 はともにほとんど同じ程度の極めて優れた細胞生育促進性を示している。

試料 4 の細胞生育率は他の試料と比べてわずかに低い、試料 1、試料 2、試料 3 に近い値を示し、いずれも細胞生育促進性に優れている。

## 【0115】

【表 2】

繭層（試料 1）、絹糸（試料 2）および絹糸を LiSCN で溶解中に  $\text{NH}_2\text{OH}$  で処理した絹タンパク由来ポリペプチド（試料 3）、絹糸を LiSCN で溶解、脱塩後に  $\text{NH}_2\text{OH}$  で処理した絹タンパク由来ポリペプチド（試料 4）の細胞生育率

試 料	細胞生育率(%)
対照区	100
試料 1	311
試料 2	318
試料 3	319
試料 4	259

【0116】

【実施例 3】

絹タンパク由来ポリペプチドのゲル化と乳化

実施例 1 における試料 2、試料 3、試料 4 の各水溶液の一部について、濃度を 5% に調整した後に、70℃ に置いた。

試料 2 の水溶液は、透析終了時にはゲル化していた。

一方、試料 3、試料 4 の各水溶液は、70℃ に置いて 2～3 日後にゲル化した。

【0117】

ゲル化物を手で軽く摩擦すると、試料 2 のゲルは直ちに玉状の小さい塊状物が現れたが、試料 3 と試料 4 には塊状物が現れなかった。

そこで、試料 3、試料 4 の各ゲル 70 g にオリーブ油 20 g を加え、コーヒーマキサー [パーソナルミル SCM-40A (柴田科学器械工業株式会社製)] で 30 秒間攪拌したところ、試料 3 と試料 4 のいずれもクリーム状の乳化物となった。

これらの乳化物を皮膚上に強く摩擦しながら塗っても玉状の塊状物は現れず、

伸び、付着性、手触り等に極めて優れていた。

【0118】

【実施例4】

塩化カルシウム溶解絹糸の脱塩中における  $\text{NH}_2\text{OH}$  処理

家蚕が吐糸後の生繭層 200 g を炭酸ソーダ 4 g、水 8 kg の混合した煮沸液（約 100℃）に 10 分間浸漬し、精練した（「試料5」）。

この間、よく攪拌した。

絹糸（試料5）の内の 50 g を約 80℃ の塩化カルシウム 160 g、エタノール 133 g、水 207 g の混合液に浸漬し、よく攪拌した。

絹糸は 20 分間で溶解した。

この溶解液を透析膜に入れ水で透析した。

【0119】

透析の間、溶解液の 20 倍量の水を透析外液とし 30 分ごとに水を 3 回変えた。

この時点は透析の途中で、脱塩は約 1 / 2 程度終えた段階である。

この透析中のフィブロイン溶液（濃度約 6%）100 g（45℃）に 50%  $\text{NH}_2\text{OH}$  を 10 cc 加え、さらに 1N  $\text{NaOH}$  を加えて pH 9 にした。

そのまま 4 時間置いた後に、ギ酸を加え pH 2 とし、透析膜に入れこの液を水で透析した。

【0120】

透析終了後に水溶液をプラスチック板上に流し、乾燥してフィルムとした。これを「試料6」とする。

試料5と試料6について、[実施例1]と同じ方法で分子量を電気泳動で調べた。

試料5にはフィブロインのH鎖とL鎖が[実施例1]の試料2と同程度に明確に確認された。

試料6の電気泳動像には 85, 75, 9 kDa のバンドが確認できた。

また、試料6の水溶液を 70℃ に置いて、ゲル化した。

ゲル化物にオリーブ油と水を加え[実施例3]と同様の乳化を行ったところ、

手触り、伸び、付着性等に優れた乳化物が得られた。

#### 【0121】

##### 【実施例5】

8M臭化リチウム (LiBr) で溶解した絹糸のNH<sub>2</sub>OH処理

【実施例4】の絹糸の50gを45℃の8M LiBr 400gに浸漬し、よく攪拌したところ、約10分で絹糸は溶解した。

溶解液を透析膜に入れ、水で透析し、フィブロイン水溶液とした。このフィブロイン水溶液を45℃にし、50% NH<sub>2</sub>OH 50mm lを加え、さらに1N NaOHで溶解液をpH9にして、4時間置いた。

その後、ギ酸でpH2とし、透析膜に入れ水で透析した。

透析後に得られた絹フィブロイン由来ポリペプチドの分子量を【実施例1】と同じように電気泳動で調べた。

#### 【0122】

その結果、85、75、35、22、9KDaの各バンドが確認できた。

また、透析終了後に、この水溶液の一部を濃度5%に調製し、70℃に置いたところ、2日後にゲル化した。

ゲル化物50gにオリーブ油15gを加えて、コーヒーマキサーで攪拌したところ、クリーム状の乳化物が得られ、手触り、伸び、付着性に優れていた。

また透析後に、この水溶液の一部をアクリル板上に流し、室温で風乾して製膜した。

得られたフィルム（厚さ約40μm）は水溶性（96%重量以上が室温の水に溶解した）を示し、非結晶性のフィブロイン由来ポリペプチドのフィルムとなった。

#### 【0123】

##### 【参考例1】

絹セリシンの不均一なペプチド結合切断による分子量低下と細胞生育性

家蚕の繭（生繭）繭層20gを80℃の8M尿素100ccに15分間浸漬し、この間よく攪拌して繭セリシンを溶解した。

繭層の練減は21.2%であった。

繭セリシン溶解液を透析膜にいれ、40倍量の水(60℃)を透析外液として透析した。

透析は2日間で水を8回変えて行った。

透析後のセリシン水溶液を煮沸(100℃)し、炭酸ソーダ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ )の濃度が0.05%となるように添加した。

【0124】

炭酸ソーダ添加後の煮沸時間が0、2、5、10、30分の各時点にセリシン水溶液を分収し、透析膜に入れ、水で透析して分子量測定試料とした。

また、細胞培養試料とした。

分子量および細胞生育率は実施例1および実施例2と同様に行って得た。

絹タンパクの成分無添加の場合を対照区(100%)とした。

結果を表3に示す。

【0125】

【表3】

煮沸している炭酸ソーダ0.05%水溶液中におけるセリシンの煮沸時間に対する分子量および細胞生育率

煮沸時間(分)	分子量	細胞生育率(%)
0	319,000	323
2	233,000	270
5	178,000	130
10	55,000	106
30	42,000	82

【0126】

【実施例7】

セリシン蚕繭層の $\text{NH}_2\text{OH}$ 処理



セリシン蚕（セリシンホープ）繭層 4 g を 9 M LiBr 200 cc に入れ、約 45℃ でよく攪拌して約 15 分で溶解した。

溶解液は非常に粘性がある。

この溶解液の 1/3 を透析膜に入れ水で透析した。

この溶解液は透析開始後 1 日以内に透析中にゲル化した。

このゲル化したものを「試料 7」とした。

#### 【0127】

残りの 2/3 の溶解液に 50% NH<sub>2</sub>OH を 10 cc 加え、さらに 1 N NaOH を加えて pH 9 とした後にこの液を二分し、45℃ に置いた。

45℃ に置いてから 1 時間後と 4 時間後に、ギ酸でそれぞれの液を pH 2 とし、これを透析膜に入れ、水で透析し（室温）、脱塩した。

1 時間後にギ酸で pH 2 とした場合は透析終了時にはゲル化していた。

このゲル化したものを「試料 8」とした。

#### 【0128】

4 時間後にギ酸で pH 2 とした場合は、透析終了時にゲル化は見られなかった。

この溶解液中のポリペプチドを「試料 9」とした。

#### 【0129】

試料 7～試料 9 の電気泳動像を図 2 に示す。

電気泳動像は実施例 1 と同様にして得た。

試料 7 の電気泳動像にはセリシンの a、d、b、c の各成分が確認できる。

試料 8 にはセリシン a、d、b の各成分は確認できないが、その外にもシャープなバンドが見えない。

試料 9 には 36, 14, 6 kDa に相当する部分にシャープなバンドが確認される。

#### 【0130】

透析中の試料 7～試料 9 を手にとって摩擦したところ、試料 7 と試料 8 には玉状の塊が出現したが、試料 9 には玉状の塊はできなかった。

機能性ポリペプチドとして利用可能な試料 9 の細胞生育性を〔実施例 2〕と同

様の方法で測定したところ、細胞生育率(%)は対照区を100%とした時、247%を示し、優れた線維芽細胞の生育促進性を示す絹セリシン由来ポリペプチドが得られた。

また、試料9の水溶液30gにオリーブ油10gを入れコーヒーマキサーで30秒攪拌したところ柔らかなクリーム状を示し、手触り、皮膚への伸び、付着性に優れていた。

【0131】

【実施例8】

コーティング材

結晶性絹超微粉末を次のように製造した。

家蚕の生糸を生糸の50倍量の0.1%炭酸ナトリウム水溶液で1時間煮沸精練し、絹糸とした。

この絹糸100gを炭酸ナトリウム50g、水2,500g、ハイドロサルファイトナトリウム5gの液に浸漬し、110℃(1.46気圧)に5時間おいた。

その後、水洗、乾燥して粉碎した。

粉碎は回転式衝撃粉碎器(不二電気工業株式会社製サンプルミルKI-1)に1mmφのフィルターを取り付けて粉碎し、さらに0.1mm間隔の金網をフィルターに取り付けて粉碎した。

次に、攪拌擂潰装置(石川式)で摩砕した後、気流式粉碎器(日清製粉株式会社製カレントジェットCJ-10)で粉碎したところ、平均粒子径2.2μmの結晶性絹超微粉末を得た。

この結晶性絹超微粉末50gと前記【実施例1】のフィブロイン由来ペプチド(試料3)の水溶液(濃度4%)50gを混合し、乾燥し、粉碎した。

粉碎は回転式衝撃粉碎機[サンプルミルKI-1(不二電気工業社製)]に1mmφのフィルターを取り付けて粉碎し、次いで摩砕(攪拌擂潰装置)し、さらに0.1mm間隔の金網をフィルターに取り付けて粉碎した。

得られた粉末の平均粒子径は2.9μmであり、手触り、付着性、成形性に優れていた。

【0132】

【実施例9】

絹フィブロインの酵素分解物の細胞生育活性

(1) 絹タンパクを酵素で分解、分離、分収

家蚕の繭を切開して蛹を除き、繭層(20g)を30倍量の8M尿素、90℃に10分浸漬し、セリシンを除外した。

抽出残さは水洗、乾燥し、これをフィブロインとした。

【0133】

フィブロイン10gを9M LiSCN 100mlに浸漬して溶かし、これに蒸留水100ml加えて、これを3,000rpm、10分間遠沈した。

上清液を50倍量の水に対して透析した。

透析は半透膜を用い30分ごとに水をかえて4回行った。

透析後に液を再び遠沈し、上清液に0.1Mリン酸水素二ナトリウム(pH8.5)を加え、pHを7から8に調製した。

そこにフィブロイン量の100分の1量のキモトリプシンを入れ、40℃で1時間置いた。

このときの上清液のタンパクを「試料10」とした。

上清液はそのままタンパク量を測定した。

【0134】

(2) 細胞培養容器へコーティング

試料10の水溶液を0.025%の濃度になるように70%エタノールを加えて調製し、それをポリスチレンのシャーレ(35mmφ、ファルコン)に1ml入れて風乾した。

対照区用シャーレは70%エタノールのみを1ml入れて風乾した。

【0135】

(3) 細胞培養

細胞は、成人由来の凍結ヒト皮膚線維芽細胞(三光純薬株式会社製)を使用した。

培地はから購入したヒト皮膚線維芽細胞増殖用低血清培地(クラボウ株式会社

製)を使用した。

シャーレ1枚につき培地2mlを入れ、8万ケの細胞を接種し、3日間培養した。

【0136】

(4) アラマーブルー色素での生細胞数の測定

シャーレ1枚につき培地2ml、アラマーブルー (IWAKI) 0.1mlの割合で入れ、37℃、2時間培養したのち、570nm、600nmの吸光度から計算したアラマーブルー色素の還元量を生細胞数とした。

以上の細胞生育率に関する測定は、実施例1と同様に行った。

【0137】

(5) 分子量

試料10の分子量は実施例1と同様にして測定した。

絹タンパクの成分無添加の場合を対照区(100%)とした、試料10をコートしたシャーレでのヒト皮膚線維芽細胞の生育率と分子量を表4に示す。

【0138】

【表4】

試料10をコートしたシャーレでのヒト皮膚線維芽細胞の分子量及び細胞生育率

	分子量	細胞生育率(%)
試料10	55000	308

【0139】

絹タンパク成分をコートしたシャーレでの細胞生育率は対照区と比べて高く、未分解フィブロインとほぼ同じ値を示した。

上記(1)、試料10の上清液のタンパク濃度を3.5%に調製し、80℃に置いたところ、3日後にゲル化した。

一方、この上清液(濃度3.5%)に試料9の液を30%(重量)混合し、室温に置いたところ、2日後にゲル化した。

これらのゲル化物、各 50 g にオリーブ油 12 g を加えて攪拌したところ、玉状物はできず、手触りのよいクリーム状物が得られた。

#### 【0140】

#### 【発明の効果】

本発明の、絹フィブロイン由来ポリペプチドは平均分子量は 1 ～ 20 万にあり、未分解絹タンパクと同程度に優れた皮膚細胞生育促進性を有する。

しかも、その水溶液は未分解絹タンパクと異なり、摩擦等のずりを加えても塊状物が現れず、優れた展延性を有している。

また乳化剤としても使用することができる。

そのために、この絹フィブロイン由来ポリペプチドから得られるフィルム、粉末、水溶液、ゲルおよびその乳化物はスキンケア素材として医薬品、医薬部外品、化粧品などに極めて有用である。

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【図 1】

図 1 は、試料 2 ～ 試料 4 の電気泳動像を示す図である。

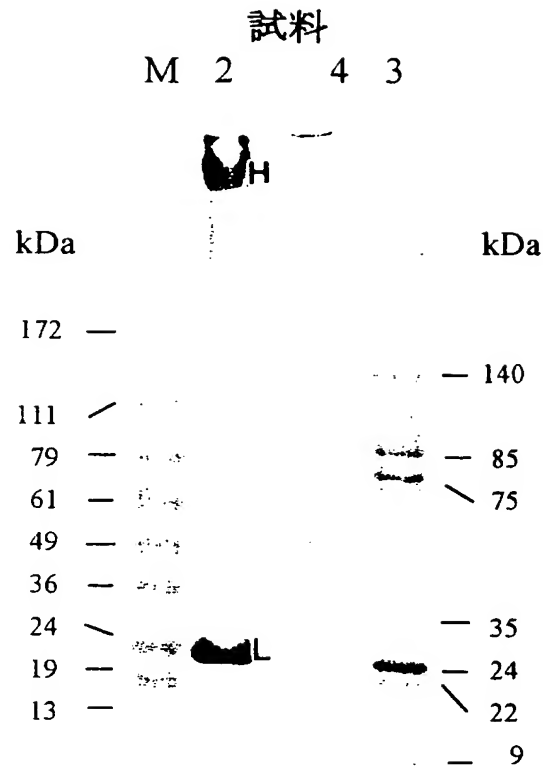
#### 【図 2】

図 2 は、試料 7 ～ 試料 9 の電気泳動像を示す図である。

【書類名】

図面

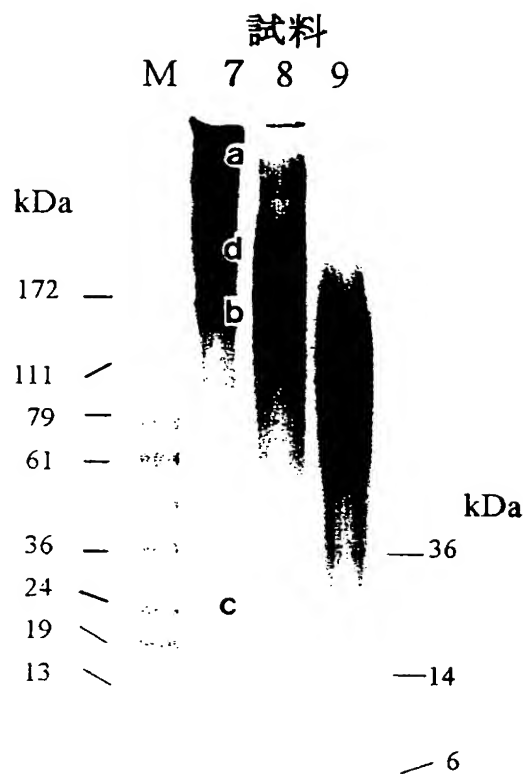
【図 1】



電気泳動像

M : マーカ  
H : フィブロインH鎖  
L : フィブロインL鎖

【図 2】



電気泳動像

M : マーカ (低分子用)

a, d, b, c : セリシンの各成分

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 未分解絹フィブロイン、セリシンまたはフィブロインH鎖、L鎖やセリシンのa成分が有する優れた細胞生育促進性と、分子量20万以下のフィブロイン、セリシンが有する優れた手触り、展延性等とを併せ持つ絹タンパク由来ポリペプチド組成物を提供することを目的とする。

【解決手段】 家蚕又は天蚕由来の絹タンパク原料であって、該絹タンパク原料の平均分子量が20万以上であり、家蚕由来の絹タンパク原料の場合には、絹フィブロインのH鎖、L鎖及びセリシンaの少なくとも一部又は全部が分解しないで残存している絹タンパク原料を、中性塩水溶液に溶解し、次いで、ペプチド結合切断物質を用いて処理し、絹タンパクの特異的アミノ酸残基間のペプチド結合を切断することを特徴とする、平均分子量が1万以上20未満であり、細胞生育促進性、展延性等にすぐれた絹タンパク由来の機能性ポリペプチド組成物の製造方法。

【選択図】 図1



# 職権訂正履歴 (職権訂正)

特許出願の番号	特願 2003-071035
受付番号	50300426208
書類名	特許願
担当官	田丸 三喜男 9079
作成日	平成 15 年 4 月 24 日

## <訂正内容 1>

訂正ドキュメント

書誌

訂正原因

職権による訂正

訂正メモ

【その他】 欄の記載事項を職権により訂正しました。

訂正前内容

【その他】 国以外のすべての者の持分割合 30 / 100

訂正後内容

【その他】 国以外のすべての者の持分の割合 30 / 100

次頁無

特願 2 0 0 3 - 0 7 1 0 3 5

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [ 5 0 1 1 6 7 6 4 4 ]

1. 変更年月日	2 0 0 1 年 4 月 2 4 日
[変更理由]	新規登録
住 所	茨城県つくば市観音台2丁目1-2
氏 名	独立行政法人農業生物資源研究所



特願 2 0 0 3 - 0 7 1 0 3 5

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[ 5 9 7 0 9 4 3 5 2 ]

1. 変更年月日

2 0 0 2 年 7 月 2 9 日

[変更理由]

住所変更

住 所

茨城県筑波郡谷和原村絹の台 3 丁目 3 - 1 - 9 - 3 0 2

氏 名

坪内 絃三